

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/36939 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 15/14

Wilhelm [DE/DE]; Ruschfeldweg 33, 33619 Bielefeld (DE). RITTER, Helge [DE/DE]; Eggeweg 11, 33617 Bielefeld (DE). SCHUBERT, Walter [DE/DE]; Am Mühlengrund 9, 39175 Biederitz (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10833

(22) Internationales Anmeldedatum:

3. November 2000 (03.11.2000)

(74) Anwalt: HOFSTETTER, Alfons; Hofstetter, Schurack & Skora, Balanstr. 57, 81541 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, CN, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:

199 53 181.1 4. November 1999 (04.11.1999) DE

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MELTEC MULTI-EPITOPE-LIGAND-TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NATTKEMPER, Tim,

(54) Title: METHOD FOR THE AUTOMATIC ANALYSIS OF MICROSCOPE IMAGES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AUTOMATISCHEN ANALYSE VON MIKROSKOPIAUFNAHMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the automatic analysis of microscope images of biological objects such as, for example, fluorescence images of cells, comprising: a) at least two microscope images are taken from a sample; b) a positive training set is determined from image excerpts; c) a negative training set is determined from a sequence of image excerpts; d) characteristic features of a training set are assigned to classification values; e) of classification values of a sequence of images are automatically determined by means of the assignment determined in D); f) the position of biological objects is recognized by comparing the classification value with a threshold value.

(57) Zusammenfassung: Ein Verfahren zur automatischen Analyse von Mikroskopaufnahmen von biologischen Objekten wie beispielsweise Fluoreszenzaufnahmen von Zellen umfasst: a) Aufnahme von mindestens zwei Mikroskopbildern einer Probe; b) Bestimmung eines positiven Trainingssets von Bildausschnitten; c) Bestimmung eines negativen Trainingssets Bildausschnitten; d) Zuordnung von charakteristischen Merkmalen der Trainingssets zu Klassifikationswerten; e) automatische Bestimmung der Klassifikationswerte folgender Aufnahmen mittels der in d) bestimmten Zuordnung; f) Erkennung der Position biologischer Objekte durch Vergleich des Klassifikationswertes mit einem Schwellwert.

WO 01/36939 A2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5

Verfahren zur automatischen Analyse von Mikroskopaufnahmen

10

Beschreibung:

15

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur automatischen Analyse von Mikroskopaufnahmen von biologischen Objekten, insbesondere zur Analyse von Fluoreszenzaufnahmen von Zellen.

20 In der modernen biomedizinischen Forschung werden in zahlreichen Experimenten unter anderem Fluoreszenztechniken zur Markierung verwandt, um biologisch signifikante Objekte unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Bei den Objekten kann es sich beispielsweise um Zellen eines bestimmten Typs oder in einem bestimmten Zustand handeln. Durch Fortschritte in der Automation solcher Experimente ist es in
25 den letzten Jahren für biomedizinische Labors möglich geworden, große Mengen derartiger bildgebender Experimente vollautomatisch durchzuführen.

So wird in der DE 197 09 348 C1 eine Fluoreszenz-Mikroskoptechnik beschrieben, die einen Satz von n Bildern einer einzelnen Probe liefert, indem die Probe mit
30 Lymphozyten mit n verschiedenen Fluorochrommarkern präpariert wurde. In jedem Bild fluoreszieren andere Untergruppen der Lymphozyten und erscheinen mit leuchtenden Abgrenzungen. Jeder Lymphozyt in der Probe hat in dem Satz von Bildern sein spezifisches Fluoreszenzverhalten. Er fluoresziert in einer Untergruppe von Bildern und ist in dem Rest des Bildersatzes nicht sichtbar.

Um die Fluoreszenzmuster aus dem Bildersatz zu extrahieren, müssen zunächst die fluoreszierenden Lymphozyten in den n Bildern detektiert werden. Die fluorochrommarkierten Lymphozyten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Anzahl, Lokation und Intensität. Da so große Mengen an Bildern und Bilddaten anfallen, aus denen zuerst die Informationen gelesen werden müssen, um diese dann biologisch zu interpretieren, entsteht ein sog. "Flaschenhals" in der Auswertung der Experimente. Eine Bildinterpretation durch menschliche Angestellte ist nicht durchführbar, da sie zu zeitaufwendig ist und ihre Ergebnisse häufig unzuverlässig sind. Die Ursache hierfür liegt in der ermüdenden visuellen Auswertungsarbeit, die mit einem Konzentrationsverlust schon nach kurzer Zeit einhergeht. Zudem unterscheiden sich die zu detektierenden Objekte hinsichtlich ihrer Anzahl, Lokation und Intensität. Daher schwanken Bildparameter wie Kontrast und Rauschen von Bild zu Bild. Außerdem weisen die Objekte, wie z.B. Zellen in Gewebeproben erhebliche Variationen hinsichtlich ihrer Form und Größe auf.

Es besteht so die Notwendigkeit von automatischen Auswertungsverfahren, welche in einem Bild die zu detektierenden Objekte lokalisieren.

Frühere Arbeiten zur Automatisierung der Zelldetektion richten ihr Augenmerk im wesentlichen auf modellbasierte Ansätze. Unter diesen findet sich auch die Idee, ein geometrisches Modell auf ein Gradientenensemble anzupassen (Mardia et al., 1997, In: IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 19: 1035-1042). Dazu zählt auch die Nutzung der Wellenpropagation (Hanahara und Hiyane, 1990, In: Machine Visions and Applications, 3: 97-111) oder einer Hough-Transformation, um zirkuläre Objekte zu detektieren (Gerig und Klein, 1986, In: Proc. Int. Conf. on Pattern Recognition, 8: 498-500). Diese Ansätze sind jedoch nachteiligerweise häufig sensitiv gegenüber Veränderungen der Form des Objekts und lassen sich von Laien nicht ohne weiteres anpassen. Ferner sind die Bilder aufgrund heterogener Beleuchtungsbedingungen nicht selten verrauscht, und die Zellen sind teilweise verdeckt, was eine Detektion durch Randgrenzenabtastung ungeeignet macht (Galbraith et al.; 1991, In: Cytometry, 12: 579-596).

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren der eingangs genannten Art bereitzustellen, daß ein einfaches automatisiertes, schnelles und leicht zu adaptierendes Detektionsverfahren von Zellen

- 5 Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen beschrieben.

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur automatischen Analyse von
Mikroskopaufnahmen von biologischen Objekten, insbesondere zur Analyse von
Fluoreszenzaufnahmen von Zellen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst: (a)
Aufnahme von mindestens zwei Mikroskopbildern einer Probe mit einer Vielzahl von
biologischen Objekten; (b) Auswahl eines ersten Mikroskopbildes und Markierung der
Position von Masseschwerpunkten einer Anzahl n der einzelnen in dem ersten
15 Mikroskopbild erkennbaren Objekte, wobei jedem markierten Objekt ein definierter
erster Bildausschnitt zugeordnet wird, der das markierte Objekt jeweils vollständig
umgibt und wobei jedem ersten Bildausschnitt mit einem markierten Objekt der Wert 1
zugeordnet wird und die Anzahl n von derart markierten ersten Bildausschnitten ein
positives Trainingsset ergibt; (c) Auswahl und Markierung einer Anzahl m von zweiten
20 Bildausschnitten, die zu den ersten Bildausschnitten jeweils einen vorbestimmten
Mindestabstand einhalten, wobei die Größe und Form eines zweiten Bildausschnitts
der Größe und Form des ersten Bildausschnitts entspricht und wobei jedem zweiten
Bildausschnitt der Wert 0 zugeordnet wird und die Anzahl m von derart markierten
zweiten Bildausschnitten ein negatives Trainingsset ergibt; (d) Ermittlung
25 charakteristischer Merkmale und/oder Merkmalskombinationen des positiven und
negativen Trainingssets und Zuordnung zu einem Klassifikationswert zwischen 0 und
1, wobei der Klassifikationswert den Grad der Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins
eines markierten Objekts repräsentiert und Speicherung der ermittelten Merkmale
und/oder Merkmalskombinationen; (e) Automatische Ermittlung von
30 Klassifikationswerten von allen Bildpunkten des zweiten und jedes weiteren
Mikroskopbildes mittels eines Vergleichs der Bilddaten des zweiten und jeden weiteren
Mikroskopbildes mit den in Verfahrensschritt (d) ermittelten Merkmalen und/oder
Merkmalskombinationen, wobei für jeden Bildpunkt des zweiten und jedes weiteren

Mikroskopbildes der Klassifikationswert für einen den Bildpunkt umgebenden Bildausschnitt ermittelt wird und die Größe und Form dieses Bildausschnitts der Größe und Form des ersten oder zweiten Bildausschnitts entspricht; und (f) Erkennung der Position von biologischen Objekten in dem zweiten oder jedem weiteren Mikroskopbild

5 durch Auswertung der ermittelten Klassifikationswerte, wobei die ermittelten Klassifikationswerte mit einem vorgegebenen Schwellenwert verglichen werden, der das Vorhandensein eines biologischen Objekts repräsentiert.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion von biologischen Objekten wie

10 beispielsweise Zellen in Mikroskopbildern arbeitet vorteilhafterweise mit Klassifikationswerten, die Bildausschnitten fester Größe und Form einen Wert zwischen 0 und 1 zuordnen und die wiedergeben, ob in diesem Bildausschnitt ein biologisches Objekt zu sehen ist (1) oder nicht (0). Es ist aber auch möglich, andere, voneinander verschiedene Zahlenwerte zu verwenden. In einem Bild werden alle

15 Zellen gefunden indem alle Bildbereiche einem Klassifikationswert zugeordnet werden. Durch eine einfache automatische Suche nach hohen Werten (Schwellwertanalyse) können so die Positionen der biologischen Objekte automatisch lokalisiert werden und beispielsweise in einer Datei gespeichert und weiterverarbeitet werden. Das Bereitstellen solcher Klassifikationswerte bzw. eines entsprechenden Klassifikators

20 und deren einfache Adaption im Falle von signifikanten Veränderungen der Mikroskopbilder durch Modifikationen am Mikroskop, andere Proben, andere Fluoreszenzmarker oder andere Zelltypen wird durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, welches ein künstliches neuronales Netz darstellt, ermöglicht.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren detektiert biologische Objekte wie beispielsweise Zellen in Mikroskopbildern vollautomatisch, nachdem es von einem Benutzer trainiert wird, durch Versorgung mit einer Menge von Zell-positiven Bildausschnitten. Die Handhabung ist besonders bequem, da der Benutzer zum Trainieren nur Zellen auf

30 dem Bildschirm markieren muss, was er in der sonstigen Labortätigkeit in Routine tut. Das System eignet sich insofern zur schnellen Auswertung vieler Mikroskopbilder bezüglich einer Lokalisierung von Zellen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auf Grund seiner Handhabbarkeit sehr einfach zu bedienen und auszuführen. Es eignet

sich zur Unterstützung jeder Art empirischer Arbeit mit Mikroskopbildern von biologischen Objekten im Hochschul- wie auch Industriebereich, in welchem der Durchsatz an Proben groß ist und eine objektive und reproduzierbare Auswertung notwendig ist.

5

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Probe eine Gewebeprobe und das biologische Objekt eine Zelle. Es hat sich herausgestellt, daß das Verfahren insbesondere bei der automatischen Zelldetektion Vorteile gegenüber herkömmlichen bekannten Verfahren aufweist.

10

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die zu ermittelnden biologischen Objekte vor der Aufnahme der Mikroskopbilder mit einem oder mehreren chemischen Markern markiert. Dabei kann zwischen der Aufnahme der einzelnen Mikroskopbilder ein Bleich- oder
15 Waschvorgang durchgeführt werden. Die chemischen Marker können Fluorochrommarker und die Mikroskopbilder Fluoreszenzaufnahmen sein.

Beispielsweise werden Fluorochrommarker auf Lymphozyten benutzt, um das Vorhandensein von Proteinen in der Zelloberfläche von Lymphozyten zu ermitteln.
20 Jeder Marker bindet an eine Untergruppe der Lymphozyten, die von der Existenz des entsprechenden Proteins in der Lymphozytenoberflächenmembran abhängig ist. Durch Fluoreszenzanregung treten die sich bindenden Lymphozyten mit hohen Intensitäten auf. Ein entsprechendes Mikroskopbild wird von einer CCD-Kamera aufgenommen. Danach wird der Marker mittels Bleiche von den Zellen entfernt und
25 der Vorgang wird unter Verwendung eines anderen Markers wiederholt. In dem hier beschriebenen Ausführungsbeispiel kann der das Markieren, die Bilderzeugung und das Bleichen umfassende Vorgang mit bis zu neun Markern wiederholt werden. Während jeder Wiederholung bleiben die Positionen der Lymphozyten unverändert, wodurch ein Matching oder Übereinstimmungsabgleich der Positionen zwischen den
30 verschiedenen Bildern ermöglicht wird. In diesem experimentellen Setup werden insbesondere T-Lymphozyten analysiert, die bei einem klinischen Fall einer Sarkoidose in das Muskelgewebe eingewandert sind. Die Lymphozyten sind mit $n=7$ Markern präpariert worden und es wurden sieben Fluoreszenzaufnahmen gemacht,

wobei verschiedene Untergruppen der Zellen durch Fluoreszenz in Erscheinung traten. Nach Abschluss aller n Schritte kann ein Satz von n Mikroskopbildern mit verschiedenen Lymphozyten-Untergruppen ausgewertet werden. Die Auswertung der n Mikroskopbilder erfolgt mit dem erfindungsgemäßen Verfahren.

5

Dabei ist beispielsweise die Anzahl n der einzelnen in dem Verfahrensschritt b) markierten biologischen Objekte, insbesondere Zellen, größer oder gleich 50. Für jeden markierten Punkt wird dabei entschieden, ob dieser Punkt ein Zentrum einer Zelle ist oder nicht. Da sich die beispielsweise Lymphozyten während einer Invasionssituation in organischem Fasermaterial befinden, ist ihre Form nicht zirkulär, sondern unregelmäßig länglich, und wird als vorwiegend konvex bezeichnet. Zur Klassifikation der biologischen Objekte wird eine besondere Form eines neuronalen Netzes, die sogenannte "Local Linear Map" (LLM) (Ritter, 1991, In: Artificial Neural Networks, Elsevier Science Publishers B.V.). Der LLM-Klassifikator wird durch einen Satz von Bildausschnitten trainiert, die Zellen enthalten. Zum Trainieren des LLM-Klassifikators wird gemäß dem Verfahrensschritt b) ein Bild aus dem Bildersatz ausgewählt. Des weiteren werden z.B. mittels einer Computermouse eine Gruppe fluoreszierender Zellen markiert. Die Gruppe von $N \times N$ großen Bildausschnitten um diese Zellen herum ergibt den Satz positiver Trainingsbeispiele bzw. ein positives Trainingsset. Der erste Bildausschnitt ist gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens quadratisch ausgebildet, wobei die Größe $N \times N$ bzw. die Seitenlänge N des ersten Bildausschnitts mindestens dem maximalen Durchmesser der biologischen Objekte im ersten Mikroskopbild entspricht.

Ein weiterer Satz von zweiten Bildausschnitten wird gemäß dem Verfahrensschritt c) vollautomatisch beliebig aus demselben Bild ausgewählt, wobei ein Mindestabstand von beispielsweise 3 - 5 Pixeln zu den bereits markierten ersten Bildausschnitten eingehalten wird. Dieser zweite Satz stellt den Satz negativer Trainingsbeispiele bzw. ein negatives Trainingsset dar. Die Anzahl m von zweiten Bildausschnitten ist gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens größer oder gleich 50, wobei die zweiten Bildausschnitte automatisch unter Berücksichtigung des Mindestabstands zu den jeweiligen ersten Bildausschnitten definiert werden.

In einem Ausführungsbeispiel wird für jeden Trainingsbeispielausschnitt ein d_{in} -dimensionaler Merkmalsvektor x berechnet. Der Satz der selektierten Bildausschnitte wird einer Principal-Component-Analyse (PCA) unterzogen. Dies ist eine bekannte Technik bei Klassifikationsaufgaben in der Computervision. Die grundlegende Idee der PCA ist, dass der hochdimensionale Bildausschnitt hierbei in einen wesentlich geringerdimensionalen ($d_{in} = \text{ca. } 6$) Merkmalsraum abgebildet wird. Diese Merkmale ergeben sogenannte Eingangs-Merkmalsvektoren x . Die Merkmalsvektoren haben einen deutlich geringeren Datenumfang als die Bildausschnitte selbst. Aus der Berechnung der Merkmalsvektoren für die positiven und negativen Eingangsbeispiele ergibt sich das Trainingsset des (Eingang, Ausgang)-Paares

$$\Gamma = \{(x_\alpha, y_\alpha)\}_\alpha.$$

Für das positive Trainingsset wird y_α gleich 1 gesetzt, und gleich 0 für die negativen.

Die LLM ist gegeben durch

$$\{w_i^{in} \in \mathbb{R}^{d_{in}}, w_i^{out} \in \mathbb{R}^{d_{out}}, A_i \in \mathbb{R}^{d_{in} \times d_{out}}, i = 1..I\}.$$

Ein Tripel $v_i = (w_i^{in}, w_i^{out}, A_i)$ wird als Knoten bezeichnet. Für ein Training der LLM wird ein Paar (x_α, y_α) beliebig aus Γ selektiert, und die Lernregeln

$$\Delta w_k^{in} = \epsilon^{in}(x_\alpha - w_k^{in}) \quad (1)$$

$$\Delta w_k^{out} = \epsilon^{out}(y_\alpha - y(x_\alpha)) + A_k \Delta w_k^{in} \quad (2)$$

$$\Delta A_k = \epsilon^{out}(y_\alpha - y(x_\alpha)) \frac{(x_\alpha - w_k^{in})^T}{\|x_\alpha - w_k^{in}\|_2} \quad (3)$$

werden ausgeführt. $\epsilon_{in}, \epsilon_{out}, \epsilon_A \in]0, 1[$ sind absteigende Lernschrittgrößen und K gilt für $\kappa = \arg \min_{\kappa} \{ \|x - w_{\kappa}^{in}\| \}$. Daher ist w_{κ}^{in} der nächste Nachbar zum Eingang x . Dies wird $l * 10000$ mal wiederholt.

- 5 Der trainierte LLM-Klassifikator führt eine Abbildung von Fluoreszenzbildpunkten auf Klassifikations- oder Evidenzwerte in $(0;1)$ durch. Um den Klassifikationswert für beispielsweise eine fluoreszierende Zelle an einem Bildpunkt zu berechnen, wird der Merkmalsvektor x für dessen Umgebungsregion berechnet. Der LLM-Ausgang für den Eingangs x berechnet sich durch

10

$$y(x) = w_{\kappa}^{out} + A_{\kappa}(x - w_{\kappa}^{in}) \quad (4)$$

wobei $\kappa = \arg \min_{\kappa} \{ \|x - w_{\kappa}^{in}\| \}$.

- 15 In dem beschriebenen Ausführungsbeispiel beträgt die Anzahl der Knoten $l=5$ und die Bildausschnittgröße ist $N=15$ Pixel.

Um alle biologischen Objekte, wie z.B. fluoreszierenden Zellen in dem zweiten oder jedem weiteren Bild des Bildersatzes zu detektieren, wird jeder Bildpunkt durch (4) auf seinen Klassifikationswert abgebildet. Die umgebende Bildregion des Punktes wird an
20 den Klassifikator gegeben, der deren Klassifikationswert berechnet. Durch Berechnung der Klassifikationswerte für jeden Punkt in einem Bild entsteht eine sogenannte Klassifikations- oder Evidenzabbildung des Bildes. Regionen mit hohen Klassifikationswerten oder Evidenzen weisen auf biologische Objekte wie z.B. fluoreszierende Zellen in dem korrespondierenden Fluoreszenzbild hin. Alle Punkte mit einem
25 Klassifikationswert größer als z.B. 0,5 und ohne größere Evidenzen in ihrer Nachbarschaft bilden die Gruppe von Positionen biologischer Objekte wie fluoreszierende Zellen in dem Bild. Entsprechend wird bei allen weiteren Mikroskopbildern des Bildersatzes vorgegangen.

- 30 Die automatische Ermittlung von Klassifikationswerten von allen Bildpunkten des zweiten und jedes weiteren Mikroskopbildes gemäß Verfahrensschritt e) erfolgt

gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung durch ein Scannen der Bildfläche des zweiten und jedes weiteren Mikroskopbildes.

5 In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die durch die Verfahrensschritte a) bis f) ermittelten Objektpositionen in der Gesamtzahl der Mikroskopbilder verglichen, so daß sich eine räumliche Lagebestimmung und Verteilung der Einzelobjekte in der Probe ergibt.

10 So können beispielsweise Fluoreszenzmuster von Zellen ermittelt werden. Dabei werden nach dem Vorgang der Zelldetektion in allen Bildern lokal korrespondierende Fluoreszenzstellen in verschiedenen Bildern gefunden, um Fluoreszenzen derselben Zelle auf ihr Markerkombinationsmuster abzubilden. Diese Korrespondenzanalyse beruht ausschließlich auf den Positionen der Zellen in den Bildern und stellt eine schwierige Aufgabe dar, da die ermittelten Positionen ein und derselben Zelle in
15 verschiedenen Bildern nicht immer exakt gleich sind. Außerdem variiert die Anzahl fluoreszierender Zellen in den Bildern stark. Beide Aspekte machen ein einfaches Matching auf der Grundlage lediglich der detektierten Zellpositionen unmöglich. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren werden derartige Probleme vermieden, indem die Klassifikationswerte bzw. Evidenzen aller Bilder des Satzes von Bildern ausgewertet
20 werden.

Indem die Klassifikationswerte bzw. Evidenzen aller n Bilder wie voranstehend beschrieben ermittelt werden, ergeben sich n Klassifikations- bzw. Evidenzwerte für jeden Punkt. Dann wird für jeden Punkt der Maximalevidenzwert selektiert und an
25 seinen Koordinaten in eine neue Evidenzabbildung eingetragen. Diese Abbildung wird als "Master Evidence Map" bezeichnet, da jedes biologische Objekt wie beispielsweise eine Zelle, das in wenigstens einem der Bilder auftrat, in dieser Abbildung durch einen hohen Evidenzwert repräsentiert wird. Durch Anwendung des Verfahrensschritts f) auf die „Master Evidence Map“ ergeben sich alle Positionen der biologischen Objekte.
30 Dieses Set von M Zellpositionen $\{(x_i, y_i)\}$ wird als "Masterset" bezeichnet. Anschließend werden für jedes biologische Objekt aus dem „Masterset“ die binären Fluoreszenzwerte $f_j^{(i)}$ gesammelt. f_j von $p_i = (f_1^{(i)}, \dots, f_n^{(i)})$ wird auf 1 gesetzt, wenn

ein biologisches Objekt wie z.B. eine Zelle im j-ten Fluoreszenzbild des Bildersatzes in enger Nachbarschaft zu ihren Koordinaten (x_i, y_i) detektiert wurde. Eine einfache lokale Matchingprozedur zwischen dem Masterset und den Klassifikationswerten der für alle Fluoreszenzbilder detektierten Positionen der biologischen Objekte bzw. Zellpositionen ergibt die binären Fluoreszenzmuster aller detektierter Objekte bzw. Zellen.

Eine erfindungsgemäße Verwendung des beschriebenen neuen Verfahrens zur automatischen Analyse von Mikroskopaufnahmen von biologischen Objekten ist die automatisierte Zellklassifikation von fluoreszierenden Zellen. So wurde beispielsweise ein Satz von sieben Fluoreszenzbildern gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgenommen. Die sieben verschiedenen Marker sind cd2, cd3, cd4, cd8, cd11b, cd19 und cd26; diese sind bei der Fluoreszenzmikroskopie übliche Antikörper-Marker. Das Trainingsset aller Zellausschnitte wurde von Hand selektiert, und zwar aus dem cd4-Bild. In jedem Bild wurden fluoreszierende Zellen mit Hilfe des LLM-Klassifikators detektiert. Mit Hilfe der Maximalbedingung der Klassifikationswerte bzw. Evidenzen, die von der LLM errechnet wurden, wurde die „Master Evidence Map“ erzeugt. Von der „Master Evidence Map“ wurden die Positionen von $M = 550$ fluoreszierenden Zellen extrahiert. Schließlich ergab der Schritt des lokalen Matchings die Markerkombinationsmuster p_j , $j = 1, \dots, 550$.

Zur Betrachtung der Verteilung der Markerkombinationsmuster innerhalb der Gruppe von Lymphozyten wurden deren binäre Muster $(f_1^{(i)}, \dots, f_7^{(i)})$ durch eine einfache Abbildung vom dualen System in das Dezimalsystem auf ein numerisches Label abgebildet. Die Häufigkeiten der Muster wurden gezählt und in einem Histogramm dargestellt (Histogramm von $2^7 = 128$ Balken). Dabei ergibt sich, dass nur 24 von 128 möglichen Mustern in der gesamten Gruppe von Lymphozyten gefunden wurden. Es dominieren drei Muster der Anzahl nach, (1000000) (= 1), (0010000) (=8) und (1010000) (=9). Dies sind Zellen, die sich nur an cd2 oder an cd4 oder nur an beide banden. Die übrigen Häufigkeiten liegen unter 30.

Um einen Eindruck hinsichtlich der Koinzidenz eines bestimmten Markers im Vergleich zu übrigbleibenden Markern zu erhalten, wurde für jeden Marker ein

korrespondierendes Histogramm berechnet. Es wurde die absolute Anzahl der Zellen, die mit diesem ausgewählten Marker fluoreszierten und die Anzahl der Zellen an, die mit diesem Marker und mit dem Marker fluoreszierten, dargestellt. Es konnte ermittelt werden, dass die absolute Anzahl fluoreszierender Zellen stark variiert. Am dominantesten sind die Marker cd2 und cd4. Lymphozyten, die mit dem Marker cd19 fluoreszenzmarkiert sind, treten selten auf und koinzidieren nur einmal mit einem anderen Marker (cd2). Dies bedeutet, dass dieser Marker hochgradig selektiv ist. Eine starke Koinzidenz kann beispielsweise auch zwischen den Paaren (cd2, cd8), (cd3, cd8) und (cd2, cd3) beobachtet werden.

10

In dem beschriebenen Ausführungsbeispiel wurden Mikroskopbilder von einem einzigen visuellen Feld aufgezeichnet und analysiert. Ist eine große Anzahl mehrerer hundert visueller Bilder gegeben, dann ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, innerhalb einer relativ kurzen Zeit eine präzise statistische Analyse derjenigen Immunzellen-Untergruppen, welche die Stellen im Gewebe penetriert haben, vorzulegen.

15

5

Verfahren zur automatischen Analyse von Mikroskopaufnahmen

10

Ansprüche:

15

1. Verfahren zur automatischen Analyse von Mikroskopaufnahmen von biologischen Objekten, insbesondere zur Analyse von Fluoreszenzaufnahmen von Zellen,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Verfahren folgende Schritte umfasst:

20

- a) Aufnahme von mindestens zwei Mikroskopbildern einer Probe mit einer Vielzahl von biologischen Objekten;
- b) Auswahl eines ersten Mikroskopbildes und Markierung der Position von Masseschwerpunkten einer Anzahl n der einzelnen in dem ersten Mikroskopbild erkennbaren Objekte, wobei jedem markierten Objekt ein definierter erster Bildausschnitt zugeordnet wird, der das markierte Objekt jeweils vollständig umgibt und wobei jedem ersten Bildausschnitt mit einem markierten Objekt der Wert 1 zugeordnet wird und die Anzahl n von derart markierten ersten Bildausschnitten ein positives Trainingsset ergibt;
- c) Auswahl und Markierung einer Anzahl m von zweiten Bildausschnitten, die zu den ersten Bildausschnitten jeweils einen vorbestimmten Mindestabstand einhalten, wobei die Größe und Form eines zweiten

25

30

Bildausschnitts der Größe und Form des ersten Bildausschnitts entspricht und wobei jedem zweiten Bildausschnitt der Wert 0 zugeordnet wird und die Anzahl m von derart markierten zweiten Bildausschnitten ein negatives Trainingsset ergibt;

- 5 d) Ermittlung charakteristischer Merkmale und/oder Merkmalskombinationen des positiven und negativen Trainingssets und Zuordnung zu einem Klassifikationswert zwischen 0 und 1, wobei der Klassifikationswert den Grad der Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines markierten Objekts repräsentiert und Speicherung der ermittelten
- 10 Merkmale und/oder Merkmalskombinationen;
- e) Automatische Ermittlung von Klassifikationswerten von allen Bildpunkten des zweiten und jedes weiteren Mikroskopbildes mittels eines Vergleichs der Bilddaten des zweiten und jeden weiteren Mikroskopbildes mit den in Verfahrensschritt d) ermittelten Merkmalen
- 15 und/oder Merkmalskombinationen, wobei für jeden Bildpunkt des zweiten und jedes weiteren Mikroskopbildes der Klassifikationswert für einen den Bildpunkt umgebenden Bildausschnitt ermittelt wird und die Größe und Form dieses Bildausschnitts der Größe und Form des ersten oder zweiten Bildausschnitts entspricht; und
- 20 f) Erkennung der Position von biologischen Objekten in dem zweiten oder jedem weiteren Mikroskopbild durch Auswertung der ermittelten Klassifikationswerte, wobei die ermittelten Klassifikationswerte mit einem vorgegebenen Schwellenwert verglichen werden, der das Vorhandensein eines biologischen Objekts repräsentiert.

25

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Probe eine Gewebeprobe und das biologische Objekt eine Zelle ist.

30

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,

daß die zu ermittelnden biologischen Objekte vor der Aufnahme der Mikroskopbilder mit einem oder mehreren chemischen Markern markiert werden.

- 5 4. Verfahren nach Anspruch 3,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die zu ermittelten Objekte vor der Aufnahme der Mikroskopbilder mit
 mehreren chemischen Markern markiert werden, wobei zwischen der
10 Aufnahme der einzelnen Mikroskopbilder ein Bleich- oder Waschvorgang
 durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die chemischen Marker Fluorochrommarker und die Mikroskopbilder
15 Fluoreszenzaufnahmen sind.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Mikroskopbilder mittels einer CCD-Kamera aufgenommen und
20 digitalisiert werden.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Anzahl n der einzelnen in dem Verfahrensschritt b) markierten
25 biologischen Objekte größer oder gleich 50 ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß der erste Bildausschnitt quadratisch ausgebildet ist, wobei die Größe bzw.
30 die Seitenlänge des ersten Bildausschnitts mindestens dem maximalen
 Durchmesser der biologischen Objekte im ersten Mikroskopbild entspricht.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Anzahl n von zweiten Bildausschnitten größer oder gleich 50 ist, wobei die zweiten Bildausschnitte automatisch unter Berücksichtigung des Mindestabstands zu den jeweiligen ersten Bildausschnitten definiert werden.

5

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß die automatische Ermittlung von Klassifikationswerten von allen Bildpunkten des zweiten und jedes weiteren Mikroskopbildes gemäß Verfahrensschritt e) durch ein Scannen der Bildfläche des zweiten und jedes weiteren Mikroskopbildes erfolgt.

10

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß der Schwellenwert des Klassifikationswerts, der das Vorhandensein eines biologischen Objekts repräsentiert, mindestens 0,5 beträgt.

15

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß die durch die Verfahrensschritte a) bis f) ermittelten Objektpositionen in der Gesamtzahl der Mikroskopbilder verglichen wird, so daß sich eine räumliche Lagebestimmung und Verteilung der Einzelobjekte in der Probe ergibt.

20

13. Verwendung eines Verfahrens gemäß dem Anspruch 1 zur automatisierten Zellklassifikation von fluoreszierenden Zellen.

25

30

THIS PAGE BLANK

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESSENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 25729 | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 10833 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/2000 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/11/1999 |
| Anmelder MELTEC MULTI-EPITOPE-LIGAND-TECHNOLOGIES GMBH | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1



wie vom Anmelder vorgeschlagen



keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Ein Verfahren zur automatischen Analyse von Mikroskopaufnahmen von biologischen Objekten wie beispielsweise Fluoreszenzaufnahmen von Zellen umfasst :

- a) Aufnahme von mindestens zwei Mikroskopbildern einer Probe
- b) Bestimmung eines positiven Trainingssets von Bildausschnitten
- c) Bestimmung eines negativen Trainingssets von Bildausschnitten
- d) Zuordnung von charakterischen Merkmalen der Trainingssets zu Klassifikationswerten
- e) automatische Bestimmung der Klassifikationswerte folgender Aufnahmen mittels der in d) bestimmten Zuordnung
- f) Erkennung der Position biologischer Objekte durch Vergleich des Klassifikationswertes mit einem Schwellwert

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N15/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETERecherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | US 5 287 272 A (HALL THOMAS L ET AL) 15. Februar 1994 (1994-02-15) Spalte 15, Zeile 20 - Spalte 17, Zeile 30 ---- | 1,13 |
| A | US 5 741 648 A (RAO JIAN YU ET AL) 21. April 1998 (1998-04-21) Zusammenfassung; Beispiel 6 ---- | 1,13 |
| A | US 5 181 259 A (RORVIG MARK E) 19. Januar 1993 (1993-01-19) Spalte 1, Zeile 54 - Spalte 2, Zeile 57 Spalte 3, Zeile 17 - Spalte 4, Zeile 2 Spalte 5, Zeile 30 - Spalte 8, Zeile 17 ---- | 1,13 |
| A | US 5 245 672 A (WILSON CHARLES L ET AL) 14. September 1993 (1993-09-14) Spalte 1, Zeile 40 - Spalte 2, Zeile 53 Spalte 6, Zeile 49 - Spalte 8, Zeile 13 ----- -/- | 1,13 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Mai 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESCHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | WO 97 37327 A (VXTREME INC ;CHADDHA NAVIN (US)) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) Zusammenfassung ---- | 1,13 |
| A | GB 2 320 352 A (NIPPON ELECTRIC CO) 17. Juni 1998 (1998-06-17) Zusammenfassung; Abbildung 1 ----- | 1,13 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/10833

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5287272 A | 15-02-1994 | US 4965725 A | 23-10-1990 |
| | | US 5544650 A | 13-08-1996 |
| | | US 5740270 A | 14-04-1998 |
| | | US 5939278 A | 17-08-1999 |
| | | AT 140327 T | 15-07-1996 |
| | | AU 628342 B | 17-09-1992 |
| | | AU 3541589 A | 03-11-1989 |
| | | BG 51463 A | 14-05-1993 |
| | | BR 8907355 A | 19-03-1991 |
| | | CA 1323700 A | 26-10-1993 |
| | | CN 1037035 A,B | 08-11-1989 |
| | | DE 68926796 D | 14-08-1996 |
| | | DE 68926796 T | 07-11-1996 |
| | | DK 262490 A | 01-11-1990 |
| | | EP 0336608 A | 11-10-1989 |
| | | ES 2090033 T | 16-10-1996 |
| | | FI 101653 B | 31-07-1998 |
| | | GR 3021252 T | 31-01-1997 |
| | | HK 1003583 A | 30-10-1998 |
| | | HU 59239 A,B | 28-04-1992 |
| | | JP 4501325 T | 05-03-1992 |
| | | MC 2101 A | 15-02-1991 |
| | | NO 904341 A | 03-12-1990 |
| | | RO 106931 B | 30-07-1993 |
| | | SG 46454 A | 20-02-1998 |
| | | RU 2096827 C | 20-11-1997 |
| | | WO 8909969 A | 19-10-1989 |
| | | ZA 8902558 A | 27-12-1989 |
| US 5741648 A | 21-04-1998 | US 5733721 A | 31-03-1998 |
| | | US 6194165 B | 27-02-2001 |
| | | US 5824495 A | 20-10-1998 |
| US 5181259 A | 19-01-1993 | NONE | |
| US 5245672 A | 14-09-1993 | NONE | |
| WO 9737327 A | 09-10-1997 | AU 2551597 A | 22-10-1997 |
| GB 2320352 A | 17-06-1998 | JP 2815045 B | 27-10-1998 |
| | | JP 10177650 A | 30-06-1998 |
| | | AU 4836997 A | 18-06-1998 |
| | | CA 2224770 A | 16-06-1998 |
| | | US 6067369 A | 23-05-2000 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FOCO

09/85 638

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/36939 A3(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 15/14

(DE). RITTER, Helge [DE/DE]; Eggeweg 11, 33617 Bielefeld (DE). SCHUBERT, Walter [DE/DE]; Am Mühlengrund 9, 39175 Biederitz (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10833

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. November 2000 (03.11.2000)

(74) Anwalt: HOFSTETTER, Alfons; Hofstetter, Schurack & Skora, Balanstr. 57, 81541 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, CN, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
199 53 181.1 4. November 1999 (04.11.1999) DEVeröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MELTEC MULTI-EPITOPE-LIGAND-TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 1. November 2001

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NATTKEMPER, Tim, Wilhelm [DE/DE]; Ruschfeldweg 33, 33619 Bielefeld

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE AUTOMATIC ANALYSIS OF MICROSCOPE IMAGES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AUTOMATISCHEN ANALYSE VON MIKROSKOPIKAUFNAHMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the automatic analysis of microscope images of biological objects such as, for example, fluorescence images of cells, comprising: a) recording at least two microscope images of a sample; b) determining a positive training set from image excerpts; c) determining a negative training set from image excerpts; d) assigning classification values to characteristic features of a training set; e) automatically determining classification values of subsequent images by means of the assignment determined in D); f) detecting the position of biological objects by comparing the classification value with a threshold value.

(57) Zusammenfassung: Ein Verfahren zur automatischen Analyse von Mikroskopaufnahmen von biologischen Objekten wie beispielsweise Fluoreszenzaufnahmen von Zellen umfasst: a) Aufnahme von mindestens zwei Mikroskopbildern einer Probe; b) Bestimmung eines positiven Trainingssets von Bildausschnitten; c) Bestimmung eines negativen Trainingssets von Bildausschnitten; d) Zuordnung von charakteristischen Merkmalen der Trainingssets zu Klassifikationswerten; e) automatische Bestimmung der Klassifikationswerte folgender Aufnahmen mittels der in d) bestimmten Zuordnung; f) Erkennung der Position biologischer Objekte durch Vergleich des Klassifikationswertes mit einem Schwellwert.

WO 01/36939 A3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 00/10833

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N15/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | US 5 287 272 A (HALL THOMAS L ET AL) 15 February 1994 (1994-02-15) column 15, line 20 -column 17, line 30 --- | 1, 13 |
| A | US 5 741 648 A (RAO JIAN YU ET AL) 21 April 1998 (1998-04-21) abstract; example 6 --- | 1, 13 |
| A | US 5 181 259 A (RORVIG MARK E) 19 January 1993 (1993-01-19) column 1, line 54 -column 2, line 57 column 3, line 17 -column 4, line 2 column 5, line 30 -column 8, line 17 --- | 1, 13 |
| A | US 5 245 672 A (WILSON CHARLES L ET AL) 14 September 1993 (1993-09-14) column 1, line 40 -column 2, line 53 column 6, line 49 -column 8, line 13 --- | 1, 13 |
| | -/-- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2001

Date of mailing of the international search report

01/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. nal Application No

PCT/EP 00/10833

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | WO 97 37327 A (VXTREME INC ;CHADDHA NAVIN (US)) 9 October 1997 (1997-10-09) abstract | 1,13 |
| A | GB 2 320 352 A (NIPPON ELECTRIC CO) 17 June 1998 (1998-06-17) abstract; figure 1 | 1,13 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/10833

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5287272 A | 15-02-1994 | US 4965725 A | 23-10-1990 |
| | | US 5544650 A | 13-08-1996 |
| | | US 5740270 A | 14-04-1998 |
| | | US 5939278 A | 17-08-1999 |
| | | AT 140327 T | 15-07-1996 |
| | | AU 628342 B | 17-09-1992 |
| | | AU 3541589 A | 03-11-1989 |
| | | BG 51463 A | 14-05-1993 |
| | | BR 8907355 A | 19-03-1991 |
| | | CA 1323700 A | 26-10-1993 |
| | | CN 1037035 A, B | 08-11-1989 |
| | | DE 68926796 D | 14-08-1996 |
| | | DE 68926796 T | 07-11-1996 |
| | | DK 262490 A | 01-11-1990 |
| | | EP 0336608 A | 11-10-1989 |
| | | ES 2090033 T | 16-10-1996 |
| | | FI 101653 B | 31-07-1998 |
| | | GR 3021252 T | 31-01-1997 |
| | | HK 1003583 A | 30-10-1998 |
| | | HU 59239 A, B | 28-04-1992 |
| | | JP 4501325 T | 05-03-1992 |
| | | MC 2101 A | 15-02-1991 |
| | | NO 904341 A | 03-12-1990 |
| | | RO 106931 B | 30-07-1993 |
| | | SG 46454 A | 20-02-1998 |
| | | RU 2096827 C | 20-11-1997 |
| | | WO 8909969 A | 19-10-1989 |
| | | ZA 8902558 A | 27-12-1989 |
| US 5741648 A | 21-04-1998 | US 5733721 A | 31-03-1998 |
| | | US 6194165 B | 27-02-2001 |
| | | US 5824495 A | 20-10-1998 |
| US 5181259 A | 19-01-1993 | NONE | |
| US 5245672 A | 14-09-1993 | NONE | |
| WO 9737327 A | 09-10-1997 | AU 2551597 A | 22-10-1997 |
| GB 2320352 A | 17-06-1998 | JP 2815045 B | 27-10-1998 |
| | | JP 10177650 A | 30-06-1998 |
| | | AU 4836997 A | 18-06-1998 |
| | | CA 2224770 A | 16-06-1998 |
| | | US 6067369 A | 23-05-2000 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10833

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N15/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | US 5 287 272 A (HALL THOMAS L ET AL) 15. Februar 1994 (1994-02-15) Spalte 15, Zeile 20 - Spalte 17, Zeile 30 --- | 1, 13 |
| A | US 5 741 648 A (RAO JIAN YU ET AL) 21. April 1998 (1998-04-21) Zusammenfassung; Beispiel 6 --- | 1, 13 |
| A | US 5 181 259 A (RORVIG MARK E) 19. Januar 1993 (1993-01-19) Spalte 1, Zeile 54 - Spalte 2, Zeile 57 Spalte 3, Zeile 17 - Spalte 4, Zeile 2 Spalte 5, Zeile 30 - Spalte 8, Zeile 17 --- | 1, 13 |
| A | US 5 245 672 A (WILSON CHARLES L ET AL) 14. September 1993 (1993-09-14) Spalte 1, Zeile 40 - Spalte 2, Zeile 53 Spalte 6, Zeile 49 - Spalte 8, Zeile 13 --- | 1, 13 |
| | --- -/- | |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Mai 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10833

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | WO 97 37327 A (VXTREME INC ;CHADDHA NAVIN (US)) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) Zusammenfassung ----- | 1,13 |
| A | GB 2 320 352 A (NIPPON ELECTRIC CO) 17. Juni 1998 (1998-06-17) Zusammenfassung; Abbildung 1 ----- | 1,13 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/10833

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 5287272 A | 15-02-1994 | US 4965725 A | 23-10-1990 |
| | | US 5544650 A | 13-08-1996 |
| | | US 5740270 A | 14-04-1998 |
| | | US 5939278 A | 17-08-1999 |
| | | AT 140327 T | 15-07-1996 |
| | | AU 628342 B | 17-09-1992 |
| | | AU 3541589 A | 03-11-1989 |
| | | BG 51463 A | 14-05-1993 |
| | | BR 8907355 A | 19-03-1991 |
| | | CA 1323700 A | 26-10-1993 |
| | | CN 1037035 A, B | 08-11-1989 |
| | | DE 68926796 D | 14-08-1996 |
| | | DE 68926796 T | 07-11-1996 |
| | | DK 262490 A | 01-11-1990 |
| | | EP 0336608 A | 11-10-1989 |
| | | ES 2090033 T | 16-10-1996 |
| | | FI 101653 B | 31-07-1998 |
| | | GR 3021252 T | 31-01-1997 |
| | | HK 1003583 A | 30-10-1998 |
| | | HU 59239 A, B | 28-04-1992 |
| | | JP 4501325 T | 05-03-1992 |
| | | MC 2101 A | 15-02-1991 |
| | | NO 904341 A | 03-12-1990 |
| | | RO 106931 B | 30-07-1993 |
| | | SG 46454 A | 20-02-1998 |
| | | RU 2096827 C | 20-11-1997 |
| | | WO 8909969 A | 19-10-1989 |
| | | ZA 8902558 A | 27-12-1989 |
| US 5741648 A | 21-04-1998 | US 5733721 A | 31-03-1998 |
| | | US 6194165 B | 27-02-2001 |
| | | US 5824495 A | 20-10-1998 |
| US 5181259 A | 19-01-1993 | KEINE | |
| US 5245672 A | 14-09-1993 | KEINE | |
| WO 9737327 A | 09-10-1997 | AU 2551597 A | 22-10-1997 |
| GB 2320352 A | 17-06-1998 | JP 2815045 B | 27-10-1998 |
| | | JP 10177650 A | 30-06-1998 |
| | | AU 4836997 A | 18-06-1998 |
| | | CA 2224770 A | 16-06-1998 |
| | | US 6067369 A | 23-05-2000 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)